R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

IMPERIAL MYCOLOGICAL INSTITUTE
13 DEC 1939

135

G. LUCHETTI

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLA FLORA BLASTOMICETICA DI ALCUNI FORMAGGI PECORINI ITALIANI

Estratto dai *Proc. Verb. della Soc. Toscana di Sc. Naturali*
Vol. XLVI n° 3.

Atti della Società Toscana di Scienze Naturali
Processi Verbali — Volume XLVI — N. 3

Luchetti G.

Contributo allo studio della flora blastomicetica di alcuni formaggi pecorini italiani.

(Presentata dal Segretario)

RIASSUNTO. — *L'autore descrive alcune specie di blastomiceti asporigeni da lui rinvenuti in campioni di formaggio pecorino italiano di diversa provenienza.*

Seguendo il concetto già altre volte da noi [1]) esposto, che la presenza di lieviti nel latte e nel formaggio abbia necessariamente una importanza non trascurabile nella maturazione dei formaggi stessi, in relazione anche agli studi di Korolew [2]) e di Sacchetti [3]), abbiamo voluto portare le nostre ricerche anche nel campo dei formaggi derivati dal latte di pecora i quali, specie in alcune regioni d'Italia, hanno un interesse econ mico non indifferente.

Ai fini dello studio propostoci prendemmo in esame i seguenti formaggi pecorini:

---

[1]) Luchetti G. e Nanni T. — *Su di alcuni fermenti del formaggio e sulle variazioni da essi indotte nella composizione del latte.* Nuovi annali dell'agricoltura. Anno XV, pag. 17. Roma, 1935.

[2]) Korolew S. A. — *Ossnovi tiechniciesskoi mikrobiologii molocnovo diela.* Mosca e Leningrado, 1932.

[3]) Sacchetti M. — *Contributo alla conoscenza della flora microbica di alcuni formaggi italiani.* I e II. Archive f. Mikr., Vol. 3, pag. 650 e Vol. 4 pag. 427. 1933.

Campione N° 1 - Formaggio delle colline presso Corridonia (Prov. di Macerata)
» » 2 » del preappennino maceratese
» » 3 » dei monti di Visso (Macerata)
» » 4 » » » »
» » 5 » della campagna romana
» » 6 » di Alghero (Sardegna)
» » 7 » della pianura pisana.

Per meglio chiarire il criterio seguito nella scelta dei campioni da studiare diremo subito che i campioni N. 1 - 2 - 6 - sono di fabbricazione a tipo puramente casalingo con lavorazione ridottissima di latte proveniente da nuclei di pochissime pecore; i campioni N. 3-4 pur avendo identica origine differiscono tra loro per il fatto (da noi non accertato però personalmente) che mentre nella fabbricazione del primo entrano anche piccole quantità di latte di vacca, in quelle del secondo non si utilizza che puro latte di pecora. Dei campioni N. 5-6-7 non sappiamo indicare con ulteriore precisione la provenienza essendo stati acquistati dal commercio.

Dai sette campioni di formaggio isolammo un certo numero di ceppi che esaminati più attentamente risultarono appartenere ad undici specie diverse tutte asporigene, sette delle quali descriviamo nel presente lavoro.

I ceppi che ora descriviamo sono i seguenti:

Ceppo N° 2 — Proveniente dai campioni N° 2-3-4
» » 3 — » » » 3-4
» » 5 — » » » 1-7
» » 6 — » » » 7
» » 8 — » » » 6
» » 9 — » » » 5-7
» » 10 — » » » 5

Per eseguire l'isolamento dei ceppi prelevammo dalla massa del campione, con le comuni norme di asepsi, alcune fettine sottilissime di materiale (esclusa la corteccia) che poi lasciammo macerare per alcune ore in brodo di fagiuoli sterile mantenuto alla temperatura di 35°-37° C., agitando di frequente in modo da ottenere una disgregazione quanto più possibile completa del formaggio, che a stagionatura completa risulta di pasta molto compatta e dura, e la fuoriuscita dei germi in esso racchiusi.

Allestimmo le colture di isolamento con alcune goccie di detto brodo, convenientemente diluito con acqua sterile, usando come substrato agar-fagiuoli glucosato.

Ciò premesso passiamo alla descrizione dei ceppi studiati.

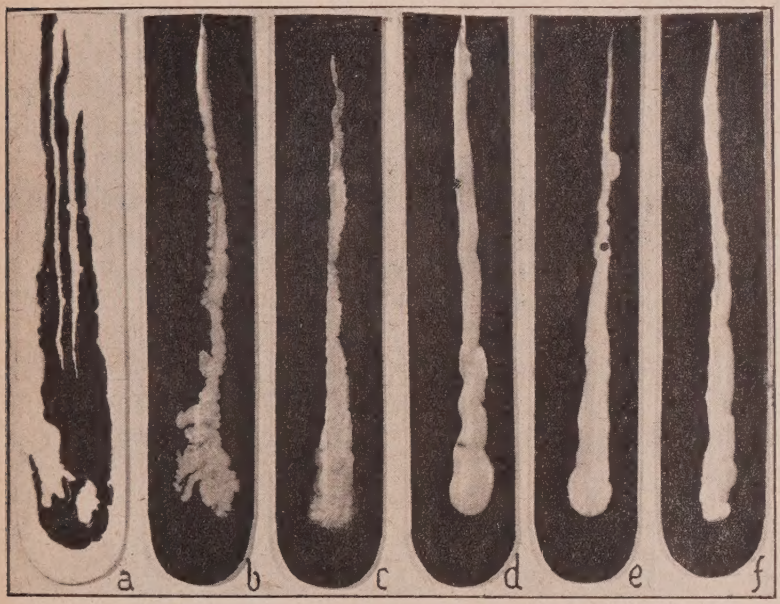

Fig. 1 — Colture a striscio dei ceppi N° 2 (*Monilia nigra*, Burri e Staub); 3 e 6 (*Trichosporon-Proteomyces* sp.); 8 (*Torulopsis aeria*, (Saito) Lodder, var. *Parva*, n. var.); 9 (*Torulopsis candida*, Lodder); 10 (*Torulopsis aeria* (Saito) Lodder).

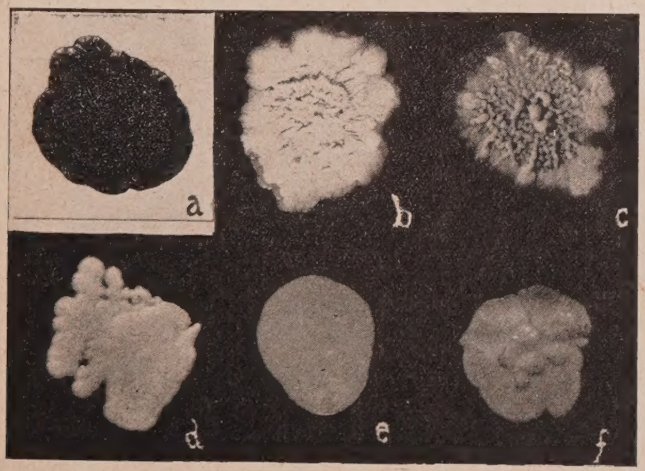

Fig. 2 — Colonie giganti dei ceppi N° 2 - 3 - 6 - 8 - 9 - 10.
(circa $^2/_3$ grand. naturale)

Ceppo N° 2.

Provenienza: isolato il 13 luglio 1935 da un campione di formaggio pecorino del preappennino maceratese ed il 22 luglio 1935 da due campioni di formaggio pecorino di Visso (Macerata).

Malto: al 15° giorno forte intorbidamento del liquido, spessa membrana bruno-olivastra e deposito al fondo. Fermenta l'estratto di malto.

Cellule ovali piuttosto grosse, gemmanti, catenulate, con plasma granuloso o guttulato. Non si ha presenza di vero micelio. Dimensioni delle cellule μ 6,6 — 8,2 × 6,6 — 13,2.

Agar-malto: patina estesa, notevolmente plicata, bianco-giallastra, con orlo lobato, di rapido sviluppo.

Cellule da subrotonde ad ovali, lungamente ovali, ellittiche, talvolta anche cilindriche, generalmente catenulate. Abbozzi miceliari chiari, ialini, articolati.

Blastospore con plasma ialino, finemente granuloso. Dimensioni varie: μ 5 — 6,6 × 13,2 — 18,2 in quelle cilindriche, μ 6,6 × 10 — 13,2 in quelle ellittiche, μ 5 — 6,6 × 6,6 — 10 in quelle ovali. Assenza di artrospore (fig. 3).

Fig. 3 — Microfotografia di *Monilia nigra*, Burri e Staub.
(ingr. circa 850 diam.)

Agar-fagiuoli: lo striscio su agar-fagiuoli, (fig. 1, *a*), è simile a quello su agar-malto ma presenta la particolarità di assumere in tempo più o

meno lungo (da dieci a trenta giorni circa) una colorazione da brunastra fino a nero ebano, lucente. Caratteri morfologici come su agar-malto.

Colonia gigante su agar-fagiuoli: (fig. 2, *a*) circolare, del diametro di mm. 25-30, di color nero intenso, lucente, con estesa zona centrale notevolmente rilevata e plicata, circondata da fascia degradante con striature radiali; orlo lobato.

Gelatina: sviluppo scarso sia in superficie che lungo il fittone.

Latte: acidifica, coagula e peptonizza.

Fermentazione degli zuccheri:

destrosio	+	maltosio	—
levulosio	+	lattosio	—
galattosio	—	raffinosio	—
mannosio	—	inulina	—
saccarosio	+		

Assimilazioni:

sostanze azotate:

peptone	+	KNO_3	+
asparagina	+	$(NH_4)_2\ SO_4$	+
urea	+		

sostanze carboniate:

destrosio	+	saccarosio	+
levulosio	+	maltosio	+
mannosio	+	inulina	+
galattosio	+	mannite	+
raffinosio	+	glicerina	+
lattosio	+		

Sviluppo in presenza di alcool etilico: buono.

Posizione sistematica: sul riferimento sistematico di questo ceppo ritorneremo con altro lavoro, essendo in corso uno studio comparativo su alcuni stipiti di blastomiceti a pigmento nero. Possiamo però fin da ora affermare che il ceppo in esame è probabilmente riferibile per i suoi caratteri a Monilia nigra quale fu sommariamente descritta da Burri e Staub.

Ceppo N° 3.

Provenienza: isolato il 22 luglio 1935 da due campioni di formaggio pecorino di Visso (Macerata).

Malto: al 15° giorno a 24° C. spessa membrana superficiale fortemente increspata, risaliente agli orli. Notevole deposito ed intorbidamento.

Filamenti pseudo-micelici ialini di μ 1,65 - 2,5 di spessore, articolati, con plasma granuloso o finemente guttulato. Presenza di blasto-ed artrospore (fig. 5, *a*). Le prime misurano μ 4 — 5,8 × 5 — 6,6; le seconde μ 3,3 — 4,1 × 3,3 — 6,6.

Agar-malto: patina bianca, continua, superficiale, poltacea, rilevata, opaca, di aspetto farinoso, con superficie molto increspata, orlo lobato-frangiato. Filamenti come in malto, meno abbondanti. Apparato blastosporeo di tipo vario, richiamante talvolta quadri di tipo *Enantiothamnus-Mycotoruloides*, più difficilmente *Candida*. Le blastospore hanno plasma omogeneo con guttule e misurano μ 4 — 6,6 × 5 — 8,3. Artrospore catenulate, ialine, guttulate o granulose, di μ 3,3 — 5 × 4 — 6,5 (Fig. 1, b).

Colonia gigante: (fig. 2, *b*) circolare, opaca, bianca, poltacea, con larga zona rilevata al centro, circondata da una fascia piatta, plicata, con sottili increspature e solchi radiali poco marcati, delimitata da un'ampia zona piatta, esile, semitrasparente, notevolmente estesa.

Gelatina: sviluppo abbondante in superficie e lungo il fittone. Non fluidifica.

Latte: acidifica e coagula ma non peptonizza.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate:

peptone	+	KNO_3	+
asparagina	+	$(NH_4)_2SO_4$	+
urea	+		

sostanze carboniate:

destrosio	+	maltosio	+
levulosio	+	lattosio	+
mannosio	+	raffinosio	+
galattosio	+	glicerina	+
saccarosio	+	mannite	+

Sviluppo in presenza di alcool etilico: buono.

Posizione sistematica: la caratteristica morfologica più saliente di questo ceppo è quella di essere provvisto di blastospore e di artrospore e di formare colonie giganti del tipo cerebroide. È riferibile quindi, secondo le più recenti precisazioni in materia, al Genere *Trichosporon* di von Behrend (Puntoni, 1935) od a *Trichosporon-Proteomyces* (Cif. e Red.).

Quanto alla specie, non trovando riscontro nelle poche finora descritte e tenuto conto della scarsissima precisazione nella sistematica del gen. *Trichosporon*, riteniamo opportuno distinguerla da quelle finora conosciute in attesa di ulteriore revisione di tutto il genere.

Trichosporon-Proteomyces sp. (n. sp.).

Filamenti ialini di μ 1,65 — 2,5 *di spessore, articolati, plasma granuloso o finemente guttulato; blastospore di* μ 4 — 6,6 × 5 — 8,3; *artrospore di* μ 3,3 — 5 × 3,3 — 6,6; *non presenti clamidospore. Apparato blastosporeo richiamante talvolta il tipo Enantiothamnus-Mycoturuloides, talaltra più raramente, il tipo Candida.*

Colonia gigante poltacea, bianca, opaca, circolare, con rilievo centrale esteso e fascia piatta, plicata, increspata da solchi radiali, nel margine esterno, circondata da zona periferica esile, semitrasparente. Sugli agar patina bianca, continua, superficiale, poltacea, rilevata, opaca, con superficie molto increspata e di aspetto farinoso, ad orlo lobato-frangiato.

Abbondante sviluppo in gelatina, sia in superficie che lungo il fittone, senza fluidificazione. Acidifica il latte e lo coagula senza peptonizzarlo; non fermenta gli zuccheri che però assimila molto bene (destrosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, raffinosio); assimila anche glicerina e mannite e si sviluppa in presenza di alcool etilico.

In mezzi liquidi forma spessa membrana superficiale fortemente increspata, talvolta risaliente agli orli; notevole intorbidamento e deposito al fondo.

Hab.: isolata da formaggio di latte di pecora a Visso (Macerata), luglio 1935.

Ceppo N° 5.

Provenienza: isolato il 13 luglio 1935 da un campione di formaggio pecorino delle colline di Corridonia (Macerata) ed il 4 agosto 1935 da un campione di formaggio pecorino della pianura pisana.

Malto: al 15° giorno a 24° C. liquido limpido, scarso deposito, spessa coperta bianca più densa al margine. Filamenti ialini, settati, ramificati, parte dei quali si risolvono in artrospore formanti più o meno lunghe catene e con il tempo disarticolantisi. Tali artrospore hanno origine apicale, basale o intercalare. Hanno plasma guttulato o vacuolato, misurano μ 5 — 8,2 × 5 — 11,5. Assenza di blastospore. Sono invece presenti clamidospore intercalari, generalmente abbinate, ovali o più spesso rotonde, del diametro di μ 5 — 6,5 con plasma ialino granuloso (Fig. 4).

Fig. 4 — Microfotografia di *Geotrichum candidum*.
(ingr. circa 900 diam.)

Agar-malto: vegetazione superficiale, estesa, farinosa, ialina, semitrasparente, sottile, delicata, un poco rilevata e grinzosa in corrispondenza dello striscio. Caratteri morfologici simili a quelli delle colture in malto. Dimensioni delle artrospore μ 3,2 — 8,2 × 5 — 15. (Fig. 4).

Agar-fagiuoli: sviluppo scarsissimo di patina trasparente, tenuissima, appena visibile ma assai estesa, frangiata.

Colonia gigante: tenuissimo velo da semitrasparente a trasparente, ad orlo sinuoso-frangiato. Data la natura della colonia gigante di questo ceppo non ci fu mai possibile ottenerne buone riproduzioni fotografiche.

Gelatina: sviluppo buono ma non fluidificazione al 60° giorno.

Latte: acidifica e coagula ma non peptonizza.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate:

peptone	+	KNO_3	+
asparagina	+	$(NH_4)_2SO_4$	+
urea	+		

Sviluppo in presenza di alcool etilico: buono.

Posizione sistematica: trattasi, come è chiaro di un tipico artrosporeo riferibile al genere *Geotrichum* e verosimilmente al gruppo di GEOTRICHUM CANDIDUM (= *Geotrichum lactis*) Link.

CEPPO N° 6.

Provenienza: isolato il 4 agosto 1935 da un campione di formaggio pecorino della pianura pisana.

Malto: dopo 15 giorni a 24° C. spessa coperta molto increspata e plicata, anello risaliente, deposito al fondo, liquido limpido.

Filamenti miceliari ialini, septati, con plasma omogeneo o guttulato, risolventisi in artrospore e blastospore, con intercalate clamidospore, di spessore variabile da μ 2,4 a μ 3,3 eccezionalmente anche μ 5-10 nelle vecchie colture. I filamenti di spessore maggiore sono spesso rigonfiati in vicinanza dei setti (fig. 5, *b*).

Blastospore ialine con plasma granuloso, da rotonde ad ovali, di μ 4 — — 5 × 4 — 7.

Artrospore con plasma granuloso, di μ 3 — 3,4 × 7,4 — 14,7.

Clamidospore ialine con plasma granuloso, rotonde, del diametro di μ 9,6 — 10,2.

Agar-malto: patina di rapida crescita, estesa, con rilievo cerebroide centrale ed orlo piatto, sinuoso, poltacea, bianca, con superficie granulosa e farinosa (fig. 1, *c*).

Colonia gigante: bianca, estesa, con superficie farinosa, orlo sinuoso, forte rilievo centrale cerebroide, contornato da una fascia degradante con leggeri solchi radiali, del diametro di mm. 25-30 (fig. 2, *c*).

Gelatina: abbondante sviluppo superficiale senza fluidificazione.

Latte: acidifica, coagula e peptonizza.

Formazione di spore: negativa.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate:

peptone	+	KNO_3	+
asparagina	+	$(NH_4)_2SO_4$	+
urea	+		

sostanze carboniate:

destrosio	+	maltosio	+
levulosio	+	lattosio	+
mannosio	+	raffinosio	+
galattosio	+	glicerina	+
saccarosio	+	mannite	+

Sviluppo in presenza di alcool etilico: buono.

Posizione sistematica: in base ai caratteri suesposti ed a quanto si è detto per il ceppo N° 3 riteniamo trattarsi di *Trichosporon-Proteomyces* (Cif. e Red.).

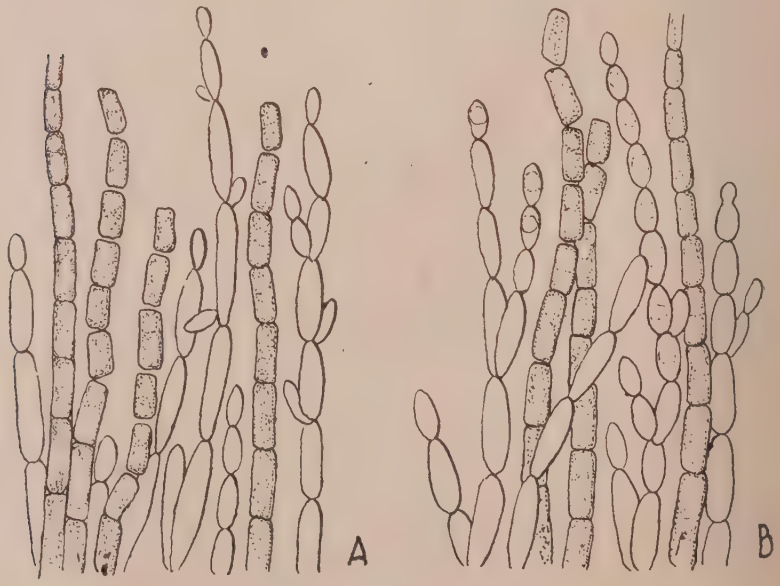

Fig. 5 — Figura schematica di *Trichosporon - Proteomyces* sp.
A = Ceppo N° 3 — B = Ceppo N° 6

Per quanto si riferisce ai caratteri specifici, essi sembrano riprendere quelli fissati per il ceppo N° 3, collimando le proprietà fisiologiche. Tali proprietà però non sono di grande ausilio nella discriminazione speciologica e per tale ragione, fermando l'attenzione sui caratteri colturali e morfologici non crediamo di assimilare lo stipite in esame con il precedente N° 3.

Siccome il genere è tutto da rivedersi dal punto di vista speciologico, come già si è detto, riteniamo opportuno distinguere i due ceppi:

1° — per i caratteri colturali (ad es. l'aspetto degli strisci)

2° — per i caratteri morfologici:

blastospore	ceppo N° 3	4 — 6,6 × 5 — 8,3
	» » 6	4 — 5 × 4 — 7
artrospore	» » 3	3,3 — 5 × 3,3 — 6,6
	» » 6	3 — 3,4 × 7,4 — 14,7
filamenti	» » 3	1,65 — 2,5
	» » 6	2,4 — 3,3 opp. 5 — 10
clamidospore	» » 3	non presenti
	» » 6	9,6 — 10,2

Ceppo N° 8.

Provenienza: isolato il 30 agosto 1935 da un campione di formaggio pecorino di Alghero (Sardegna).

Malto: al 15° giorno a 24° C. intorbidamento, anello e forte deposito al fondo. Cellule rotonde o subrotonde con guttula e plasma omogeneo o finemente granuloso, di μ 3,2-4,8 di diametro, miste a cellule più piccole di μ 1,8-2,4. (fig. 6, *B*).

Agar-malto: patina continua, di non molto rapida crescita, estesa, bianca, opaca, poltacea, liscia, umida, ad orlo continuo. Invecchiando la patina si fa più densa ed abbondante, diviene leggermente rilevata al centro con formazione di piccoli punti mentre l'orlo degradante assume talvolta aspetto frangiato. (fig. 1, *d*).

Cellule di aspetto e dimensioni come in malto.

Colonia gigante: (fig. 2, *d*) circolare, piatta, bianca, omogenea, liscia, ad orlo continuo, senza particolari strutture.

Gelatina: sviluppo discreto ma non fluidificazione al 60° giorno.

Latte: non coagula.

Formazione di spore: negativa.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate:

peptone	+	KNO_3	+
asparagina	+	$(NH_4)_2SO_4$	+
urea	—		

sostanze carboniate:

glucosio	+	saccarosio	+
levulosio	+	lattosio	+
galattosio	+	raffinosio	+
mannosio	+	glicerina	—
maltosio	+	mannite	—

Sviluppo in presenza di alcool etilico: buono.

Posizione sistematica: in base ai caratteri fissati e con riferimento alla monografia della Lodder la specie descritta sembrerebbe vicina a *Torulopsis aeria* (Saito) Lodder. Tuttavia se ne discosta per le dimensioni più piccole, il colore decisamente bianco delle patine, anche in malto, il comportamento in latte diverso anche da quello presentato dal ceppo N° 10 che riteniamo, come vedremo, *Torulopsis aeria*, ed inoltre per l'aspetto della colonia gigante.

In considerazione di ciò, almeno per il momento, il ceppo descritto crediamo tener distinto in nuova varietà:

Torulopsis Aeria (Saito) Lodder var. Parva n. var.

Ceppo N° 9.

Provenienza: isolato il 4 agosto 1935 da un campione di formaggio pecorino della pianura pisana ed il 15 ottobre 1935 da un campione di formaggio pecorino della campagna romana.

Malto: dopo 15 giorni a 20° C. intorbidamento, deposito ed anello. Cellule rotonde o subrotonde di μ 3,3 circa di diametro, con grossa gut-

tula oleosa centrale, miste a cellule giganti di μ 5,7 — 6,6 di diametro, pure provviste di guttula oleosa centrale.

Agar-malto: (fig. 1, *e*) patina continua, estesa, di rapida crescita, bianca o leggermente giallastra in dipendenza del substrato, poltacea, liscia, umida, opaca, ad orlo continuo.

Colonia gigante: (fig. 2, *e*) circolare, cremosa, bianca o leggermente gialliccia, un poco rilevata, priva di particolari strutture, ad orlo continuo.

Gelatina: scarso sviluppo in superficie, sviluppo leggero e senza ramificazioni lungo il fittone; non fluidificazione al 60° giorno.

Latte: acidifica e coagula ma non peptonizza.

Formazione di spore: negativa.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate:

peptone	+	KNO_3	—
asparagina	+	$(NH_4)_2SO_4$	+
urea	—		

sostanze carboniate:

destrosio	+	maltosio	+
levulosio	+	lattosio	+
mannosio	+	glicerina	+
galattosio	+	mannite	+
saccarosio	+		

Sviluppo in presenza di alcool etilico: buono.

Posizione sistematica: in base ai caratteri fissati e con riferimento alla monografia della Lodder la specie descritta rientra in Torulopsis candida (Saito) Lodder.

Ceppo N° 10.

Provenienza: isolato il 15 ottobre 1935 da un campione di formaggio pecorino della campagna romana.

Malto: dopo 15 giorni a 24° C. scarso intorbidamento con deposito ed anello.

Cellule da rotonde ad ovali, guttulate, di μ 3,3 — 6,6 × 4 — 8,2. (fig. 6, *A*).

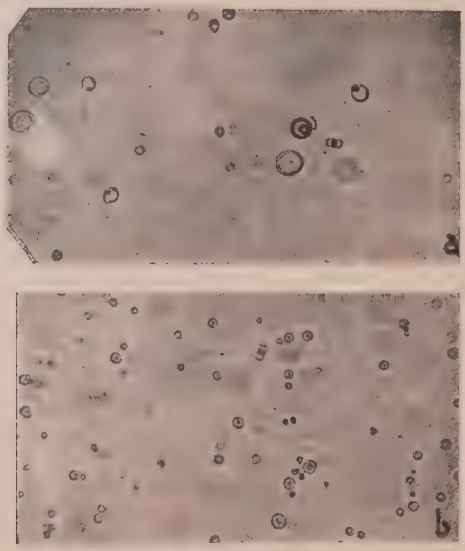

Fig. 6 — Microfotografia ad uguale ingrandimento di:
A — *Torulopsis aeria* (Saito) Lodder
B — *Torulopsis aeria* (Saito) Lodder, var. *parva* n. var.
(ingr. circa 1400 diam.)

Agar-malto: patina continua, di rapida crescita, estesa, leggermente rilevata al centro, piatta in corrispondenza degli orli lisci, cremosa, opaca, bianco-gialliccia (fig. 1, *f*).

Cellule di forma e dimensioni uguali a quelle delle colture in malto.

Colonia gigante: (fig. 2, *f*) tondeggiante, bianco-gialliccia, tendente al bruno molto pallido, con zona rilevata nella parte centrale, cremosa, con profondi solchi radiali.

Gelatina: scarso sviluppo in superficie, lungo il fittone più abbondante ma senza ramificazioni. Non fluidifica al 60° giorno.

Latte: acidifica e coagula ma non peptonizza.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate:

peptone	+	KNO_3	+
asparagina	+	$(NH_4)_2SO_4$	+
urea	+		

sostanze carboniate:

destrosio	+	lattosio	+
levulosio	+	maltosio	+
mannosio	+	glicerina	?
galattosio	+	mannite	+
saccarosio	+		

Sviluppo in presenza di alcool etilico: buono.

Posizione sistematica: in base ai caratteri fissati riteniamo trattarsi di TORULOPSIS AERIA (Saito) Lodder.

Dall'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica
della R. Università di Pisa.

Novembre 1936 - XV.